

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

(11) N° de publication :  
à utiliser que pour les  
demandes de reproduction

2 592 769

(21) N° d'enregistrement national :

86 00325

(51) Int Cl<sup>o</sup> : A 23 J 1/20; A 61 K 37/18, 35/20; C 07 K 15/08, 15/24.

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 10 janvier 1986.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : BOPi : Brevets n° 29 du 17 juillet 1987.

(40) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(71) Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE - FR.

(72) Inventeur(s) : Eric Terru, Jean-Louis Maubois, Gérard Brulé et Alice Pierre.

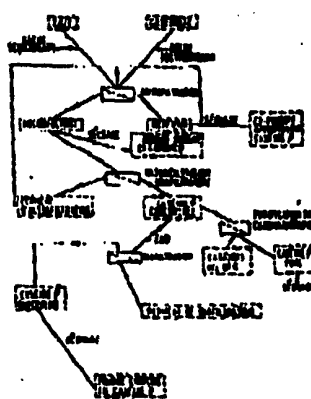
(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : Cabinet Harlé et Phélip.

(54) Procédé d'obtention d'une matière enrichie en caséine bêta, appareillage pour la mise en œuvre de ce procédé, et application des produits obtenus par ce procédé comme aliments, compléments alimentaires ou additifs en industrie alimentaire et pharmaceutique ou dans la préparation de peptides à activité physiologique.

(57) On ajoute à la substance de départ, soit un agent complexant du calcium si la matière de départ est un lait de mammifère, soit un agent polymérisant de toutes les caséines si la matière de départ est une solution aqueuse de caséinate, et on refroidit à 0 °C-7 °C. Ensuite, on soumet la substance ainsi obtenue à une microfiltration sur membrane minérale, en flux tangentiel, la vitesse de circulation de ladite substance ainsi obtenue à une microfiltration sur membrane minérale, en flux tangentiel, la vitesse de circulation de ladite substance étant de l'ordre de 4,5 m/s à 10 m/s, pour obtenir, d'une part, un microfiltrat constitué par la matière enrichie en caséine  $\beta$ , et d'autre part, un rétentat de microfiltration en tant que co-produit. On peut faire suivre d'une ultrafiltration puis, soit d'une purification par chromatographie suivie d'un séchage, soit d'une dialyse suivie d'un séchage.

Les produits obtenus (matière enrichie en caséine  $\beta$  et co-produit appauvri en caséine  $\beta$ ) ont des applications nutritionnelles, dans le domaine agro-alimentaire (industries laitières et fromagères, diététiques et pharmaceutiques). Quant à la matière enrichie en caséine  $\beta$ , elle peut également servir à préparer des peptides à activités physiologiques directes ou indirectes, tels que le  $\beta$ -casomorphine.



FR 2 592 769 - A1

La présente invention a pour objet un procédé d'obtention d'une matière enrichie en caséine  $\beta$  à partir d'un lait de mammifère ou d'un dérivé de lait de mammifère qui consiste en un caséinate, un co-produit appauvri en caséine  $\beta$  étant obtenu simultanément; la présente invention a également pour objet un appareillage pour la mise en oeuvre de ce procédé, ainsi que l'application des substances enrichies et appauvries en caséine  $\beta$ , comme aliments, compléments alimentaires ou additifs, notamment dans les industries alimentaires et pharmaceutiques, de même que l'application de la substance enrichie en caséine  $\beta$ , comme substance de départ dans la préparation de peptides à activité physiologique, comme la  $\beta$ -casomorphine.

La caséine  $\beta$  représente 34 % en poids de la caséine entière du lait de vache, soit 8,5 g/l environ, et 65 % en poids de la caséine entière des laits de femme et de chèvre. Dans ces derniers cas, elle constitue la protéine dominante. La caséine  $\beta$  du lait de vache est formée d'une chaîne peptidique unique, ne contenant ni cystéine, ni glucides, mais riche en proline. C'est une molécule relativement hydrophobe et sensible au calcium, à température égale ou supérieure à 20°C (Alais, Science du Lait, 1964).

En dehors de ses applications nutritionnelles bien connues, la caséine  $\beta$  provenant des laits de vache, de chèvre ou de femme est une matière première particulièrement intéressante pour la préparation de produits dérivés à activités pharmacologiques. Outre un phosphopeptide situé en position 15-19, ayant un pouvoir chélatant très marqué vis-à-vis des alcalino-terreux et d'autres oligo-éléments, elle contient, en position 60-66, un segment dénommé  $\beta$ -casomorphine (Brantl et Teschemacher, Milchwissenschaft, 1982, 37, 641-644), ayant une activité biologique analogue

à celle des opiates ou médiateur de la synthèse des endorphines (Mendy, Biofutur, 1984, 24, 601-661).

Les seules méthodes de préparation de la caséine  $\beta$ , qui existent à ce jour, sont des méthodes de laboratoire, conduisant à l'obtention de quantités de produit purifiées de l'ordre de quelques centaines de milligrammes, voire de quelques grammes. Toutes ces méthodes mettent en oeuvre l'utilisation d'urée en concentration relativement élevée (3,3M) et, de ce fait, susceptible de carbamyliser les 10 résidus lysyle de la chaîne peptidique de la caséine  $\beta$  ou des autres caséines. Leur rendement d'extraction est faible : 0,5 à 1 % de la caséine  $\beta$  présente dans le lait (Groves et Al., 1963) à 30 % pour la méthode d'Aschaffenburg (1963). De plus, la purification finale est effectuée par 15 chromatographie sur échangeurs d'ions et requiert l'utilisation de substances à pouvoir tampon, telles que l'imidazole ou le Tris, qui sont inacceptables sur le plan sanitaire.

La présente invention propose un nouveau procédé d'obtention d'une matière enrichie en caséine  $\beta$ , ce nouveau 20 veau procédé ne présentant aucun des inconvénients de la technique antérieure, puisqu'il conduit à l'obtention de cette matière enrichie en caséine  $\beta$  avec d'excellents rendements, qu'il est apte à être extrapolé sur une échelle industrielle, et qu'il n'utilise pas de contaminants chimiques. 25 miques.

Le Déposant a en effet découvert que les membranes minérales de microfiltration réalisent, d'une manière surprenante - ce qui sera explicité plus loin - la séparation physique de la caséine  $\beta$  après dépolymérisation de cette protéine 30 des micelles de caséine présentes dans le lait. On voit donc que cette nouvelle méthode met en jeu un mécanisme différent de celui utilisé dans l'état antérieur de la technique, puisqu'il consiste en une séparation purement physique, relevant du

simple tamisage moléculaire, et ne faisant donc pas appel à des additifs chimiques contaminants.

La présente invention a donc d'abord pour objet un procédé d'obtention, d'une part, d'une matière enrichie en caséine  $\beta$  et, d'autre part, d'un co-produit appauvri en caséine  $\beta$ , à partir d'un lait de mammifère et/ou d'un caséinate en solution aqueuse, ledit lait et ledit caséinate pouvant avoir été reconstitués à partir de poudres, caractérisés par le fait que :

- 10 a) 1) on ajoute à la substance de départ, soit un agent complexant du calcium si la matière de départ est un lait de mammifère, soit un agent polymérisant de toutes les caséines si la matière de départ est un caséinate, et 2) on porte la substance de départ ainsi additionnée à une température comprise entre environ 0°C et 7°C, l'ordre des  
15 étapes a1) et a2) pouvant être inversé; et
- b) on soumet la substance obtenue à l'étape a) à une microfiltration sur membrane minérale, en flux tangentiel, la vitesse de circulation de ladite substance étant de l'ordre  
20 de 4,5 m/s à 10 m/s, pour obtenir, d'une part, la matière enrichie en caséine  $\beta$  constituée par le microfiltrat, et, d'autre part, le co-produit constitué par le résidat de microfiltration.

On utilise notamment, comme lait de mammifère, le  
25 lait de vache ou le lait de chèvre.

On utilise cependant, de préférence, une solution aqueuse de caséinate, en choisissant, comme caséinate, un caséinate d'ammonium, de potassium, de sodium ou de calcium, ou encore un phosphocaséinate natif (une telle substance étant  
30 décrite dans le brevet français n° 74-39311), la concentration en caséinate de la solution aqueuse étant de l'ordre de 2 à 5 % en poids.

Dans le cas où la matière de départ est un lait de mammifère, on utilise à l'étape a1), comme agent complexant du  
35 calcium, un agent séquestrant, consistant en du citrate de sodium, ce composé présentant la propriété d'être de qualité alimentaire, ou encore des phosphopeptides de caséin (substances décrites dans le brevet français n° 80-02 281).

Dans le cas où la matière de départ est un caséinate, on utilise à l'étape a), comme agent polymérisant de toutes les caséines, au moins un cation bivalent choisi parmi le calcium, le magnésium, le cuivre, le fer et le zinc. En particulier, on choisit, comme agent polymérisant dans ce cas, le calcium et/ou le magnésium en mélange avec éventuellement l'un parmi le cuivre, le fer et le zinc, ce qui présente l'avantage que dans les hydrolysats peptidiques obtenus à partir de la caséine  $\beta$  résultant du procédé selon la présente invention, il y a apport d'oligo-éléments.

Dans le cas où l'on utilise le calcium, éventuellement avec un autre cation, en tant qu'agent polymérisant des caséines, on ajoute notamment de 0 à 2 g/l d'ion  $\text{Ca}^{++}$  pour une solution contenant 25g/l de caséines. Dans le cas des autres ions, on ne peut mentionner de gammes de concentration spécifiques, mais l'homme de l'art pourra les choisir compte tenu de l'usage final du produit et de la conjugaison  $\text{Ca}^{++}$ -autres cations.

La différence de nature des agents complexant ou polymérisant utilisés dans le cas où le produit de départ est un lait de mammifère ou, au contraire, est une solution aqueuse de caséinate, mérite une explication :

- dans le cas où l'on utilise un caséinate, les constituants caséines de ce produit ne sont pas sous forme micellaire ; pour ce faire, on doit ajouter du calcium qui polymérise toutes les caséines y compris la caséine  $\beta$ . Le refroidissement de la solution calcique de caséinate, qui est prévu dans l'étape a) du procédé selon la présente invention, amène la dissociation de la caséine  $\beta$  principalement, et des autres caséines, dans les proportions qui seront indiquées ci-dessous.
- lorsque l'on utilise du lait comme matière de départ, la situation est fondamentalement différente ; il y a trop d'ions  $\text{Ca}^{++}$  pour obtenir une dissociation satisfaisante de la caséine  $\beta$  et c'est, au contraire, un agent complexant, ou plutôt séquestrant, du calcium que l'on doit

ajouter au lait.

Comme indiqué ci-dessus, à l'étape a), on refroidit la substance de départ additionnée de son agent complexant ou polymérisant. Il est bien connu que le refroidissement du lait de 30°C à 5°C multiplie par 2,5 la quantité de caséine soluble (non micellaire) (Downey et Murphy, J. Dairy, Research, 1970, 37, 361-373), et l'on sait également que la caséine  $\beta$  représente 46% des protéines ainsi solubilisées par l'abaissement de température. Pierre et Brulé, dans l'article "Mineral and protein equilibria between the colloidal and soluble phase of milk at low temperature", J. Dairy Research 1981, 48, 417-428, ont montré que cette solubilisation de la caséine  $\beta$ , dont la proportion, dans la caséine soluble, passe de 25-30% à 20°C à 50-60% à 2-4°C, était due à une rupture partielle des liaisons hydrophobes existant dans la micelle entre cette caséine et les autres caséines ( $\alpha_1$  et  $\kappa$ ). Il est, par ailleurs, admis que la caséine  $\beta$ , ainsi solubilisée, se présente sous différents états de polymérisation en équilibre, sous la dépendance étroite de la température. La forme monomère prédomine à une température égale ou inférieure à 4°C, mais à 8,5°C, une polymérisation élevée existe déjà.

Concernant la gamme de températures préconisée pour la mise en oeuvre de l'étape a2) du procédé selon l'invention, on indiquera qu'en-dessous de 5°C, il est extrêmement difficile de faire fonctionner une installation de microfiltration, compte tenu des surfaces d'échange des membranes et des tuyauteries, ainsi que de l'énergie apportée par la pompe, et qu'au-dessus de 7°C, le passage sélectif de la caséine  $\beta$  est diminué jusqu'à complète annulation de la sélectivité.

La valeur de 5°C représente le compromis optimal entre la sélectivité, le débit de microfiltration et le coût énergétique du maintien à basse température de la boue de microfiltration.

Conformément au procédé de la présente invention, la substance de départ, additionnée de son agent complexant ou polymérisant et refroidie à la température indiquée, est mise à circuler à une vitesse comprise entre 4,5 m/s et 10 m/s tangentiellement à des membranes minérales de microfiltration assemblées en modules.

Parmi les membranes de microfiltration utilisables, on peut citer la membrane d'oxyde de zirconium sur support de carbone, présentant un diamètre de pores de 0,085 à 0,090  $\mu$ m, commercialisée sous la référence M6 1000 par la Société "SFEC"; et également la membrane d'alumine  $\alpha$  (céramique), présentant un diamètre de pores de 0,2  $\mu$ m fabriquée par la Société "CERAVIK".

Les membranes minérales offrent de multiples avantages : moindre réactivité de surface, facilité de nettoyage, grande résistance mécanique, lenteur, voire absence de vieillissement. Il est cependant également possible d'utiliser des membranes polymériques, par exemple des membranes à base de polycarbonate ou de polysulfone.

La vitesse de balayage à observer dans l'étape de microfiltration dépend du type de membrane utilisée, du diamètre des pores et de l'état de surface de ladite membrane. La valeur de 4,5 m/s constitue une borne inférieure qu'il y a lieu de ne pas dépasser et la limite supérieure de 10 m/s ne peut non plus être dépassée, pour des raisons techniques : perte de charge, énergie dissipée, etc... La valeur de 6 m/s constitue un compromis optimal entre la performance de la microfiltration et l'énergie à mettre en œuvre pour assurer cette vitesse.

On indique également qu'à l'étape b), c'est-à-dire à l'étape de microfiltration, on travaille de préférence à une pression qui, en amont du dispositif de microfiltration, est comprise entre 0,5 et 6 bar relatifs, de préférence entre 1,5 et 2,5 bar relatifs, et qui, en aval du dispositif de microfiltration, est comprise entre 0,0 et 5 bar relatifs, de préférence entre 0,5 et 1,0 bar relatif. Les plages possibles, qui viennent d'être indiquées ci-dessus, sont fonction de la nature de la membrane (diamètre du tube qui la contient - longueur), de la vitesse de balayage, ainsi que de la viscosité du liquide circulant.

Lors du traitement à basse température des solutions de caséinate par microfiltration, il était loin

d'être évident que le transport intra-membranaire concerne préférentiellement la caséine  $\beta$ . En effet, la taille moléculaire de cette caséine est très voisine de celle des autres caséines solubilisées (caséine K et  $\alpha_{s1}$ ). L'homme de l'art s'attendait par conséquent à un passage simultané des trois caséines  $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$  et K, et non pas à celui à 95% de la caséine  $\beta$  seule dans les conditions de l'invention.

Le spécialiste biochimiste pourrait élever l'argumentation que, le monomère de caséine  $\beta$  ayant un poids moléculaire de 24 000 daltons (ainsi que les monomères de caséines  $\alpha_{s1}$  et K), l'emploi de membranes d'ultrafiltration à pouvoir de coupure supérieur à 24 000 daltons aurait permis d'obtenir la même séparation que l'emploi de membranes de microfiltration, la séparation de ces molécules par rapport aux micelles de caséine (poids moléculaire : 25 à 250 millions de daltons) semblant d'un point de vue théorique relativement aisé. Or, du fait du colmatage lié au phénomène de polarisation, l'ultrafiltration ne réalise pas ce genre de séparation.

L'emploi de la technique de microfiltration tangentielle pour séparer des composants macromoléculaires est tout à fait nouvelle. En outre, il n'était absolument pas évident que le passage de la caséine  $\beta$  se fasse avec le rendement et la performance (taux exprimé en g/l) qui ont été observés par le Déposant. L'homme de l'art se serait plutôt attendu à un colmatage progressif et rapide de la membrane de microfiltration.

Il est donc possible, conformément au procédé de la présente invention, d'obtenir, après l'étape b), une matière contenant de 35 à 95% de caséine  $\beta$  par rapport aux protéines totales. Dans le cas de la recherche d'une pureté maximale en caséine  $\beta$ , sa teneur dans le microfiltrat varie de 1,0 à 2,5g/l, dans des conditions optimales de travail, mentionnées dans les exemples indiqués ci-après.

Conformément à la présente invention, on peut faire suivre les étapes a) et b) du procédé, telles qu'elles ont



été indiquées ci-dessus, par une étape c), suivant laquelle on soumet le microfiltrat obtenu à l'étape b) à une ultrafiltration, pour obtenir, d'une part, une substance enrichie en caséine (3), de plus forte concentration en caséine (3), et, d'autre part, un perméat d'ultrafiltration comme co-produit.

Cette ultrafiltration a pour but non seulement de concentrer la caséine (3) qui est obtenue sous forme diluée par la microfiltration de l'étape b), mais également d'ajuster la teneur en minéraux de la solution.

On utilise, pour réaliser l'ultrafiltration de l'étape c), une membrane d'ultrafiltration ayant un pouvoir de coupure inférieur ou égal à 20 000, la valeur de 20 000 pouvant être dépassée si l'on travaille à une température suffisante pour entraîner l'aggrégation, sous forme de micelles, de la caséine (3).

A l'étape c), on travaille notamment à une température comprise entre 5°C environ et la température théorique de dénaturation thermique de la caséine (3) en solution pure ; en particulier, on travaille à une température comprise entre 5°C et 80°C, et, mieux encore, à une température comprise entre 55°C et 60°C. On constate que l'ultrafiltration de l'étape c) peut donc être effectuée à une température supérieure à celle à laquelle on effectue la microfiltration de l'étape b), l'objectif étant d'améliorer le débit.

Les autres paramètres de cette ultrafiltration de l'étape c) sont classiques : on travaille à une pression qui, en amont du dispositif d'ultrafiltration, est comprise entre 1,5 et 10 bar relatifs, et qui, en aval du dispositif d'ultrafiltration, est comprise entre 0 et 8 bar relatifs, et on fait circuler la substance obtenue à l'étape b) à une vitesse comprise entre 1,5 et 6 m/s.

Conformément à d'autres caractéristiques du procédé selon la présente invention, on recycle en amont du dispositif de microfiltration, le rétentat de microfiltration obtenu à l'étape b) et, le cas échéant, le perméat d'ultra-

filtration obtenu à l'étape c).

Le rétentat ainsi obtenu, présente une teneur en protéines pouvant aller jusqu'à 50 g/l.

Dans une étape subséquente d1), on peut purifier par chromatographie à basse ou haute pression la substance enrichie en caséine  $\beta$  obtenue à l'étape c), pour obtenir, d'une part, de la caséine  $\beta$  pure, et, d'autre part, des caséines  $\alpha_1$  et  $\kappa$  comme co-produits.

On peut aussi, dans une étape d2), soumettre la substance enrichie en caséine  $\beta$  obtenue à l'étape c) à une diafiltration (cette étape d2) et l'étape c) pouvant être réalisées de façon concomitante).

On peut sécher la substance riche en caséine  $\beta$  obtenue suivant le cas à l'étape b) ou à l'étape d1) ou à l'étape d2), pour donner une poudre enrichie en caséine  $\beta$ , ainsi que le rétentat de microfiltration obtenu à la fin de l'étape b) ou le perméat de diafiltration obtenu à la fin de l'étape d2).

Le but de la diafiltration est d'éliminer une partie du (ou des) cation(s). L'ajustement de la teneur en composants autres que la caséine  $\beta$  se fera en fonction de l'utilisation que l'on veut faire du produit final (soit le soumettre à une hydrolyse pour donner des peptides comme indiqué ci-dessus, soit utilisation en l'état).

La présente invention a également pour objet un appareillage pour la mise en oeuvre du procédé qui vient d'être décrit, cet appareillage étant caractérisé par le fait qu'il comporte :

- un récipient destiné à renfermer la substance de départ additionnée de son agent complexant ou polymérisant;
- un dispositif de microfiltration comprenant un ensemble de membranes de microfiltration tubulaires;
- une première canalisation reliant ledit récipient audit dispositif de microfiltration, ladite première canalisation permettant d'introduire la substance prélevée dans ledit récipient dans ledit dispositif de microfiltration tangentiellement aux membranes, une pompe d'alimentation, une pompe de recirculation et un échangeur de chaleur étant disposés successivement sur ladite première canalisation;
- une seconde canalisation reliant la sortie dudit dispositif de

- microfiltration t un point de ladite première canalisation  
situé entre ladite pompe d'alimentation et ladite pompe de re-  
circulation, et une troisième canalisation branchée en un  
point situé entre ledit échangeur de chaleur et ledit disposi-  
5 tif de microfiltration et constituant une canalisation de  
retour vers ledit récipient, lesdites seconde et troisième  
canalisations permettant le recyclage du rétentat de mi-  
crofiltration,  
-éventuellement, un dispositif d'ultrafiltration disposé  
10 en aval dudit dispositif de microfiltration, en vue du trai-  
tement du microfiltrat et un dispositif permettant de recy-  
cler le perméat d'ultrafiltration en amont dudit dispositif  
de microfiltration;  
-éventuellement, un dispositif de purification par chroma-  
15 tographie à basse ou haute pression disposé en aval dudit  
dispositif d'ultrafiltration, en vue de traiter la substance  
enrichie en caséine  $\beta$  concentrée provenant dudit dispositif  
d'ultrafiltration;  
-éventuellement un dispositif de diafiltration disposé en  
20 aval dudit dispositif d'ultrafiltration, en vue de traiter la  
substance enrichie en caséine  $\beta$  concentrée provenant dudit  
dispositif d'ultrafiltration (ledit dispositif de diafiltra-  
tion pouvant être directement inséré dans ledit dispositif  
d'ultrafiltration); et  
25 -éventuellement, un dispositif de séchage de la caséine  
concentrée provenant dudit dispositif de microfiltration,  
dudit dispositif de purification par chromatographie et  
dudit dispositif de diafiltration, ainsi que du co-produit  
appauvri en caséine  $\beta$  provenant dudit dispositif de micro-  
30 filtration ou dudit dispositif de diafiltration.  
La présente invention concerne également l'appli-  
cation de la matière enrichie en caséine  $\beta$  obtenue, le cas  
échéant après séchage, aux étapes b), c) et d2) et de la ca-  
séine  $\beta$  pure obtenue, le cas échéant après séchage, à l'éta-  
35 pe d1) et du co-produit appauvri en caséine  $\beta$  obtenu, le  
cas échéant après séchage, aux étapes b) et d2), comme ali-  
ments, compléments alimentaires ou additifs, notamment dans  
les industries laitières, fromagères, pharmaceutiques et  
diététiques.  
Ainsi, la poudre enrichie en caséine  $\beta$ , renfermant  
de 35 à 95% des protéines totales, présente de nombreuses  
applications nutritionnelles. Quant au co-produit appauvri  
en caséine  $\beta$ , qui représente au moins de 15% des protéines  
total s, il présente des propriétés fromagères et laitières

intéressantes, du fait que l'appauvrissement en caséine  $\beta$  améliore la stabilité thermique du lait et augmente la fermeté des gels obtenus par action de la présure.

La présente invention concerne également l'application de la matière enrichie en caséine  $\beta$  obtenue, le cas échéant après séchage, aux étapes b), c) et d2), et de la caséine  $\beta$  pure obtenue, le cas échéant après séchage, à l'étape d1) pour préparer, par fragmentation enzymatique notamment en réacteur à membrane, des peptides à activité physiologique directe ou indirecte (induction de la sécrétion d'hormones), tels que la  $\beta$ -casomorphine, laquelle présente une activité dite "opiate-like".

Pour mieux faire comprendre l'objet de la présente invention, on décrira plus en détail ci-après, à titre indicatif et non limitatif, un mode particulier de réalisation du procédé d'obtention d'une matière enrichie en caséine  $\beta$  par microfiltration, en référence au dessin annexé.

Sur ce dessin :

- la figure 1 représente un schéma d'obtention de ladite matière enrichie en caséine  $\beta$ ;
- la figure 2 représente le schéma de l'appareillage nécessaire pour la mise en oeuvre de l'étape de microfiltration du procédé;
- la figure 3 représente les profils chromatographiques obtenus avec un caséinate de départ et le microfiltrat de l'exemple 1 décrit ci-dessous, cette chromatographie étant effectuée sur une colonne TSK 3000 SW, avec un tampon phosphate à pH 2,2.

Le schéma de la figure 1 s'explique par lui-même, on y voit les étapes de microfiltration, d'ultrafiltration, de diafiltration ou de purification par chromatographie, qui sont les étapes respectivement b), c), et d2) ou d1), qui ont été définies ci-dessus, ainsi que les différentes étapes de séchage.

L'appareillage représenté sur la figure 2 se compose d'un récipient 1 pour la matière de départ, d'un dispo-

5        sitif de microfiltration 2 constitué par plusieurs membranes de microfiltration 2a tubulaires, et d'une première conduite 3 reliant le récipient 1 à l'entrée du dispositif de microfiltration 2. Sur cette conduite 3, sont disposés, de façon successive, une pompe d'alimentation 4, une pompe de recirculation 5 et un échangeur de chaleur 6. La canalisation 3 est disposée de telle manière que la substance qu'elle transporte pénètre dans le dispositif de microfiltration 2, de façon tangentielle aux membranes 2a de micro-

10        filtration utilisées.

      L'appareillage représenté sur la figure 2 est complété par une deuxième conduite 7 reliant la sortie du dispositif de microfiltration 2 à un point situé sur la canalisation 3, entre les pompes 4 et 5, et également par une

15        troisième conduite 8, qui est branchée sur la canalisation 3, en un point situé entre l'échangeur de chaleur 6 et le dispositif de microfiltration 2, cette conduite 8 étant une conduite de retour vers le récipient 1.

      Les différents essais de microfiltration ont été

20        réalisés à l'aide de ce dispositif ; il constituent des exemples 1 à 5 illustrant la présente invention, les conditions dans lesquelles ont été réalisés et les résultats obtenus étant résumés dans le Tableau I (les pourcentages indiqués étant donnés en poids).

25

TABLEAU I

Exem- ple	Matière première	Agent comple- xant	Teneur en agent comple- xant (g/l)	Membranes de micro- filtration	Paramètres de la microfiltration					Caséine (obtenue)	
					Vitesse de balayage (m.s <sup>-1</sup> )	Pres- sion entrée (bar)	Pres- sion sortie (bar)	Tem- péra- ture (°C)	Débit de la mi- crofil- tration (l.h. <sup>-1</sup> m <sup>-2</sup> )	Pureté par rup- ture aux portaux micro- filtrat- ion (%)	Concen- tration dans le micro- filtrat (g/l)
1	Solution de caséine de so- dium à 2,5%	Calcium sous for- me de CaCl <sub>2</sub>	2	SPBC M 5 1000	6	2,0	0,9	5°C	25 à 30	95	1,1
2	Solution de caséinate de sodium à 2,5% concen- trée à 5% par micro- filtration	Calcium	1,75 (pour 2,5% de caséinate)	" " "	"	1,7	0,5	"	15 à 20	"	Jusqu'à 2,5 à 5% de caséinate
3	Solution de caséinate d'ammonium à 2,5%	"	1,75	" " "	"	1,5	0,5	"	25	"	1,0

TABLEAU I (Suite)

Ex- pé- ri- en- ce	Matière première	Agent comple- xant	Teneur en agent comple- xant (g/l)	Membranes de micro- filtration	Paramètres de la microfiltration				Caséine obtenue		
					Vitesse de balayage (m.s <sup>-1</sup> )	Pres- sion entrée (bar)	Pres- sion sortie (bar)	Tem- pé- ra- ture (°C)	Débit de la mi- crofil- tration (l.h. <sup>-1</sup> ) n <sup>-2</sup>	Pureté par rap- port aux protéi- nes to- tales (%)	Concen- tra- tion dans le micro- filtrat (g/l)
4	Solution de caséinate de sodium à 2,5%	Calcium sous for- me de CaCl <sub>2</sub> + magnésium sous for- me de MgCl <sub>2</sub>	0,8 + 0,8	CERAVER	5.2	1.5	0.5	5°C	15 à 20	95	0.6
5	"	Calcium sous for- me de chlorure de cal- cium	0.5	SPEC N° 6.1000	6	1.7	0.3	"	20 à 25	65	2.5

La figure 3 illustre, comme indiqué ci-dessus, les profils chromatographiques obtenus pour le caséinate de départ et pour le microfiltrat de l'exemple 1, correspondant à l'obtention de caséine (3) à 95% des protéines totales.

On indiquera également ci-après, dans le tableau II, les rapports de quelques amino-acides du microfiltrat de l'exemple 1 et du caséinate de départ :

TABLEAU II

rapports amino-acides	$\frac{\text{Pro}}{\text{Asp}}$	$\frac{\text{Pro}}{\text{Tyr}}$	$\frac{\text{Val}}{\text{Lys}}$	s Q*
caséinate de départ	1,80	3,86	1,23	122
microfiltrat (exemple 1)	3,50	8,75	1,38	19
caséine théorique	3,89	8,75	1,71	0

\* s Q = paramètre de Marchalonis et Weltman : somme des carrés des différences de composition en acides aminés d'un produit par rapport à la composition théorique (ici : caséine (3))



### REVENDICATIONS

1. Procédé d'obtention, d'une part, d'une matière enrichie en caséine  $\beta$ , et, d'autre part, d'un co-produit appauvri en caséine  $\beta$ , à partir d'un lait de mammifère et/ou d'un caséinate en solution aqueuse, ledit lait et ledit caséinate pouvant avoir été reconstitués à partir de poudres, caractérisés par le fait que :

a) 1) on ajoute à la substance de départ, soit un agent complexant du calcium si la matière de départ est un lait de mammifère, soit un agent polymérisant de toutes les caséines si la matière de départ est un caséinate, et 2) on porte la substance de départ additionnée de son agent complexant ou polymérisant à une température comprise entre environ 0°C et 7°C, l'ordre des étapes a1) et a2) pouvant être inversé; et

b) on soumet la substance obtenue à l'étape a) à une microfiltration sur membrane minérale, en flux tangentiel, la vitesse de circulation de ladite substance étant de l'ordre de 4,5 m/s à 10 m/s, pour obtenir, d'une part, la matière enrichie en caséine  $\beta$  constituée par le microfiltrat, et, d'autre part, le co-produit constitué par le réténat de microfiltration.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'on choisit, comme caséinate, un caséinate d'ammonium, de potassium, de sodium ou de calcium, ou encore un phosphocaséinate natif, la concentration en caséinate de la solution aqueuse étant de l'ordre de 2 à 5 % en poids.

3. Procédé selon la revendication 1, dans lequel on utilise un lait de mammifère comme matière de départ, caractérisé par le fait qu'à l'étape a1) on utilise, comme agent complexant du calcium, un agent séquestrant consistant en du citrate de sodium ou en un phosphopeptide de caséine.

4. Procédé selon l'une des revendications 1 et 2, dans lequel on utilise un caséinate comme matière de départ, caractérisé par le fait qu'à l'étape a1), on utilise, comme agent polymérisant de toutes les caséines, au moins un cation bivalent choisi parmi le calcium, le magnésium, le cuivre,

le fer et le zinc.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé par le fait qu'on choisit comme agent polymérisant le calcium et/ou le magnésium en mélange avec éventuellement l'un parmi le cuivre, le fer et le zinc.

6. Procédé selon la revendication 4, dans lequel on utilise le calcium, éventuellement avec un autre cation, en tant qu'agent complexant des caséines, caractérisé par le fait qu'on ajoute de 0 à 2 g/l d'ion  $\text{Ca}^{++}$  pour une solution contenant 25 g/l de caséines.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé par le fait qu'à l'étape a2), on porte, à une température de l'ordre de 5°C, la substance de départ à laquelle, si l'étape a1) a déjà été effectuée, on a ajouté l'agent complexant ou l'agent polymérisant.

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé par le fait qu'on utilise, pour la microfiltration de l'étape b), une membrane d'oxyde de zirconium sur support de carbone, dont le diamètre des pores est compris entre 0,085 et 0,090,  $\mu\text{m}$ .

9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé par le fait qu'on utilise, pour la microfiltration de l'étape b), une membrane d'alumine  $\alpha$ , dont le diamètre des pores est de 0,2,  $\mu\text{m}$ .

10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé par le fait qu'on utilise pour la microfiltration de l'étape b), une membrane polymérique choisie notamment parmi les membranes à base de polycarbonate ou de polysulfone.

11. Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé par le fait qu'à l'étape h), on fait circuler la substance obtenue à l'étape a), à une vitesse de l'ordre de 6 m/s.

12. Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé par le fait qu'à l'étape b), on travaille à une pression qui, en amont du dispositif de microfiltration, est comprise entre 0,5 et 6 bars relatifs, de préférence, entre

1,5 et 2,5 bar relatifs, et qui, en aval du dispositif de microfiltration est comprise entre 0,0 et 5 bar relatifs, de préférence entre 0,5 et 1,0 bar relatif.

13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, 5 caractérisé par le fait que, dans une étape subséquente c), on soumet le microfiltrat obtenu à l'étape b) à une ultrafiltration, pour obtenir, d'une part, une substance enrichie en caséine  $\beta$ , de plus forte concentration en caséine  $\beta$ , et, d'autre part, un perméat d'ultrafiltration comme on-pro-10 duit.

14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé par le fait qu'on utilise, pour réaliser l'ultrafiltration de l'étape c), une membrane d'ultrafiltration ayant un pouvoir de coupure inférieur ou égal à 20 000, la valeur de 20 000 15 pouvant être dépassée si l'on travaille à une température suffisante pour entraîner l'agrégation sous forme de micelles, de la caséine  $\beta$ .

15. Procédé selon l'une des revendications 13 et 14, caractérisé par le fait qu'à l'étape c), on travaille à 20 une température comprise entre 5°C environ et la température théorique de dénaturation thermique de la caséine  $\beta$  en solution pure, notamment à une température comprise entre 5°C et 80°C, et, en particulier, à une température comprise entre 55°C et 60°C.

25 16. Procédé selon l'une des revendications 13 à 15, caractérisé par le fait qu'à l'étape c), on travaille à une pression qui, en amont du dispositif d'ultrafiltration, est comprise entre 1,5 et 10 bar relatifs, et qui, en aval du dispositif d'ultrafiltration, est comprise entre 0 et 8 30 bar relatifs, et qu'on fait circuler la substance obtenue à l'étape b) à une vitesse comprise entre 1,5 et 6 m/s.

17. Procédé selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé par le fait que l'on recycle en amont du dispositif de microfiltration, le rétentat de microfiltration obtenu 35 à l'étape b), et, le cas échéant, le perméat d'ultrafiltration obtenu à l'étape c).

18. Procédé selon l'une des revendications 13 à

17, caractérisé par le fait que, dans une étape subséquente d1), on purifie par chromatographie à basse ou haute pression la substance enrichie en caséine  $\beta$  obtenue à l'étape c), pour obtenir, d'une part, de la caséine  $\beta$  pure, et, d'autre part, des caséines  $\alpha_1$  et  $\kappa$  comme co-produits.

19. Procédé selon l'une des revendications 13 à 17, caractérisé par le fait que, dans une étape d2), on soumet la substance enrichie en caséine  $\beta$  obtenue à l'étape c) à une diafiltration, cette étape d2) et l'étape c) pouvant être réalisées de façon concomitante.

20. Procédé selon l'une des revendications 1, 18 et 19, caractérisé par le fait que l'on sèche la substance riche en caséine  $\beta$  obtenue suivant le cas à l'étape b) ou à l'étape d1) ou à l'étape d2), pour donner une poudre enrichie en caséine  $\beta$ , ainsi que le rétentat de microfiltration obtenu à la fin de l'étape b) ou le perméat de diafiltration obtenu à la fin de l'étape d2).

21. Appareillage pour la mise en oeuvre du procédé tel que défini à l'une des revendications 1 à 20, caractérisé par le fait qu'il comporte :

- un récipient (1) destiné à renfermer la substance de départ additionnée de son agent complexant ou polymérisant;

- un dispositif de microfiltration (2) comprenant un ensemble de membranes de microfiltration (2a) tubulaires;

- une première canalisation (3) reliant ledit récipient (1) audit dispositif de microfiltration (2), ladite première canalisation (3) permettant d'introduire la substance prélevée dans ledit récipient (1) dans ledit dispositif de microfiltration (2) tangentiellement aux membranes (2a), une pompe d'alimentation (4), une pompe de recirculation (5) et un échangeur de chaleur (6) étant disposés successivement sur ladite première canalisation (1);

- une seconde canalisation (7) reliant la sortie dudit dispositif de microfiltration (2) et un point de ladite première canalisation (3) situé entre ladite pompe d'alimentation (4) et ladite pompe de recirculation (5), et une troisième

ne canalisation (8) branchée en un point situé entre ledit échangeur de chaleur (6) et ledit dispositif de microfiltration (2) et constituant une canalisation de retour vers ledit récipient (1), lesdites seconde (7) et troisième (8) canalisations permettant le recyclage du rétentat de microfiltration.

22 - Appareillage selon la revendication 21, caractérisé par le fait qu'il comporte un dispositif d'ultrafiltration disposé en aval du dispositif de microfiltration (2), en vue du traitement du microfiltrat et un dispositif permettant de recycler le perméat d'ultrafiltration en amont dudit dispositif de microfiltration (2).

23 - Appareillage selon la revendication 22, caractérisé par le fait qu'il comporte un dispositif de purification par chromatographie à basse ou haute pression disposé en aval du dispositif d'ultrafiltration, en vue de traiter la substance enrichie en caséine  $\beta$  concentrée provenant dudit dispositif d'ultrafiltration.

24 - Appareillage selon la revendication 22, caractérisé par le fait qu'il comporte un dispositif de diafiltration disposé en aval du dispositif d'ultrafiltration, en vue de traiter la substance enrichie en caséine  $\beta$  concentrée provenant dudit dispositif d'ultrafiltration; ledit dispositif de diafiltration pouvant être directement inséré dans ledit dispositif d'ultrafiltration.

25 - Appareillage selon l'une des revendications 21 à 24, caractérisé par le fait qu'il comporte un dispositif de séchage de la caséine  $\beta$  concentrée provenant du dispositif de microfiltration et, le cas échéant, du dispositif de purification par chromatographie, et du dispositif de diafiltration, ainsi que du co-produit appauvri en caséine  $\beta$  provenant du dispositif de microfiltration ou, le cas échéant, du dispositif de diafiltration.

26 - Application de la matière enrichie en caséine  $\beta$ , obtenue, le cas échéant après séchage, aux étapes b), c) et d2) du procédé tel que défini à l'une des reven-

dications 1 à 17, 19 et 20, comme aliment, complément alimentaire ou additif notamment dans les industries laitières, fromagères, pharmaceutiques et diététiques.

5           27 - Application de la matière enrichie en caséine<sup>β</sup> pure, obtenue, le cas échéant après séchage, à l'étape d1) du procédé tel que défini à l'une des revendications 18 et 20, comme aliment, complément alimentaire ou additif, notamment dans les industries laitières, fromagères, pharmaceutiques et diététiques.

20           28 - Application du co-produit appauvri en caséine<sup>β</sup> obtenu, le cas échéant après séchage, aux étapes b) et d2) du procédé tel que défini à l'une des revendications 1 à 17, 19 et 20, comme complément alimentaire ou additif, notamment dans les industries laitières, fromagères, pharmaceutiques et diététiques.

15           29 - Application de la matière enrichie en caséine<sup>β</sup> obtenue, le cas échéant après séchage, aux étapes b), c) et d2) du procédé tel que défini à l'une des revendications 1 à 17, 19 et 20, comme produit de départ dans la  
20           préparation, par fragmentation enzymatique, éventuellement en réacteur à membrane, de peptides à activité physiologique directe ou indirecte, telle que le <sup>β</sup>-casomorphine.

25           30 - Application de la caséine<sup>β</sup> pure, obtenue, le cas échéant après séchage, à l'étape d1) du procédé tel que défini à l'une des revendications 18 et 20, comme produit de départ dans la préparation, par fragmentation enzymatique, éventuellement en réacteur à membrane, de peptides à activité physiologique directe ou indirecte, telle que le <sup>β</sup>-casomorphine.

1/2

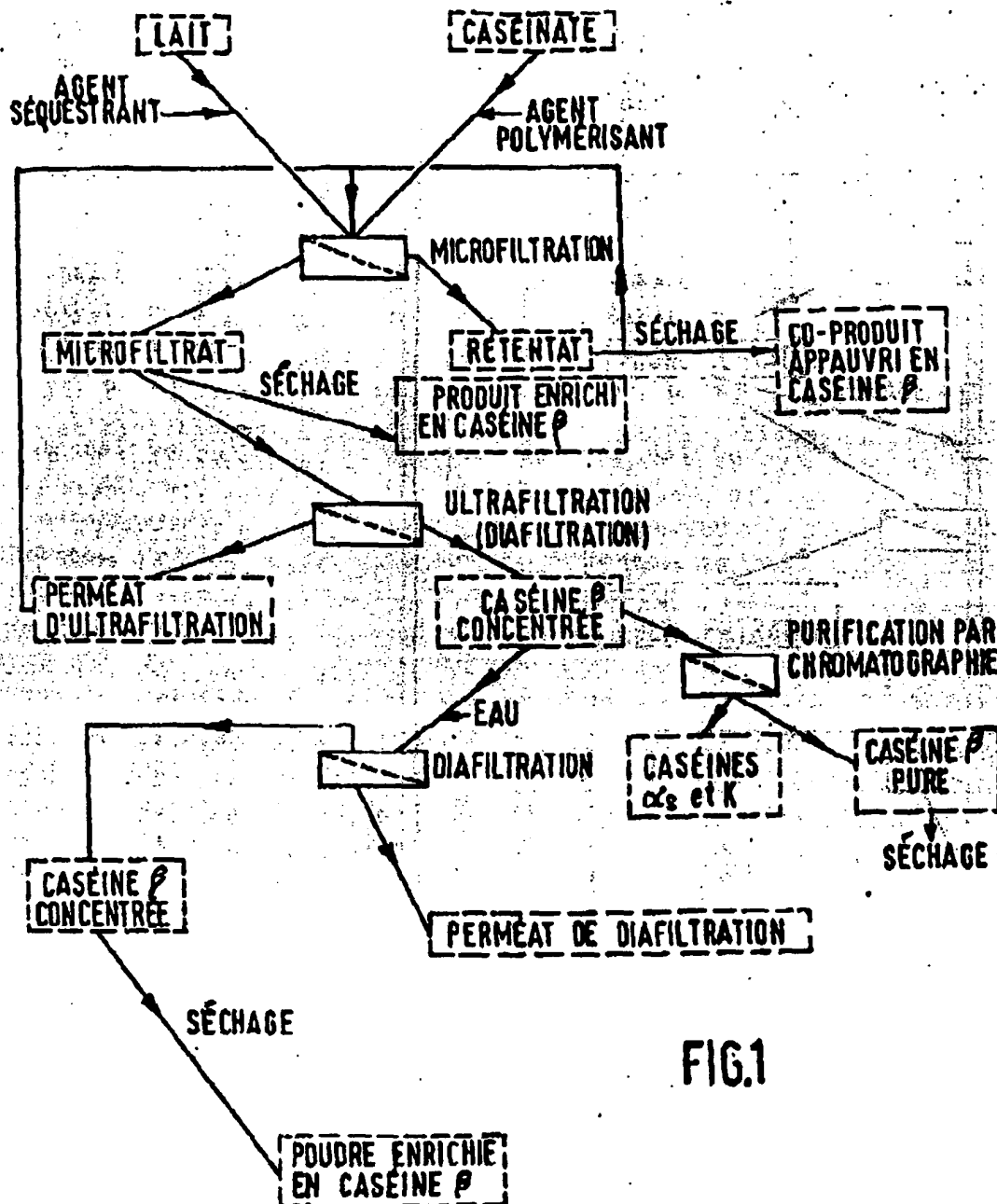


FIG.1

2/2

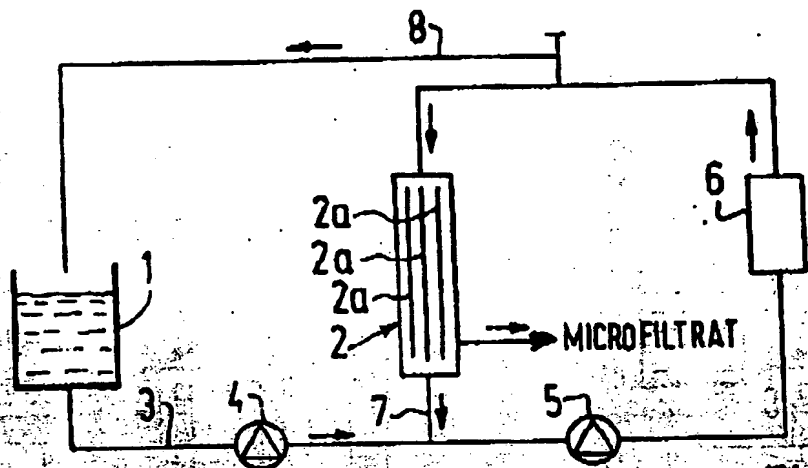


FIG. 2

INJECTION

CASÉINATE DE DÉPART

K

P

$\alpha_s$

INJECTION

MICROFILTRAT DE L'EXEMPLE 1

P

FIG. 3

